

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 223**

51 Int. Cl.:

**C07D 401/12** (2006.01)

**A61K 31/4725** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2012 PCT/US2012/039090**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12166459**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2012 E 12725228 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2726475**

54 Título: **Tripéptidos que incorporan deuterio como inhibidores del virus de la hepatitis C**

30 Prioridad:

**27.05.2011 US 201161490665 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**17.01.2018**

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)  
Route 206 and Province Line Road  
Princeton, NJ 08543-4000, US**

72 Inventor/es:

**SUN, LI-QIANG y  
SCOLA, PAUL MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 650 223 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Tripéptidos que incorporan deuterio como inhibidores del virus de la hepatitis C

## 5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos con n.º de serie 61/490.665 presentada el 27 de mayo de 2011.

10 La presente divulgación se refiere a compuestos de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-3-metil-L-valil-(4*R*)-*N*-((1*R*,2*S*)-1{[(ciclopropilsulfonil)amino]carbonil}-2-vinilciclopropil)-4-[(4-metoxi-7-cloroisoquinolin-1-il)oxi]-L-prolinamida, sus composiciones farmacéuticas, sus procesos, y los métodos de uso. Los compuestos poseen la capacidad de inhibir la proteasa NS3 (denominada también en el presente documento "serina proteasa" y son útiles en el tratamiento del virus de la hepatitis C.

15 VHC es un patógeno humano importante, que infecta, según las estimaciones, a 170 millones de personas en todo el mundo - aproximadamente cinco veces el número de personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1. Una fracción sustancial de estos individuos infectados por VHC desarrolla enfermedades hepáticas progresivas graves, incluyendo cirrosis y carcinoma hepatocelular.

20 En la actualidad, el tratamiento contra el VHC más eficaz emplea una combinación de interferón alfa y ribavirina, dando lugar a una eficacia sostenida en un 40 % de pacientes. Resultados clínicos recientes demuestran que el interferón alfa pegilado es superior al interferón alfa sin modificar como monoterapia. Sin embargo, incluso con regímenes terapéuticos experimentales que implican combinaciones de interferón alfa pegilado y ribavirina, una fracción sustancial de pacientes no tienen una reducción sostenida en la carga vírica. Por tanto, existe una necesidad clara y sin cumplir de desarrollar sustancias terapéuticas eficaces para el tratamiento de la infección por VHC.

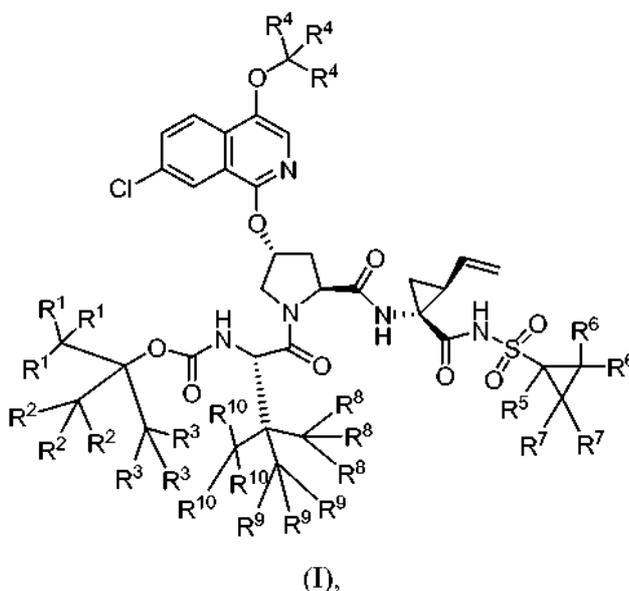
30 VHC es un virus de ARN de cadena positiva. Basándose en una comparación de la secuencia de aminoácidos deducida y la extensa similitud en la región 5' no traducida, se ha clasificado VHC como un género separado en la familia Flaviviridae. Todos los miembros de la familia Flaviviridae han desarrollado viriones que contienen un genoma de ARN de cadena positiva que codifica todas las proteínas específicas de virus conocidas mediante la traducción de un único marco de lectura abierto ininterrumpido.

35 Se encuentra una considerable heterogeneidad en el nucleótido y la secuencia de aminoácidos codificada a través del genoma de VHC. Se han caracterizado seis genotipos mayores, y se han descrito más de 50 subtipos. Los genotipos mayores del VHC difieren en su distribución a lo largo del mundo, y la significancia clínica de la heterogeneidad genética del VHC sigue siendo elusiva a pesar de numerosos estudios del posible efecto de los genotipos sobre la patogénesis y el tratamiento.

40 El genoma del ARN del VHC monocatenario tiene aproximadamente 9500 nucleótidos de longitud y tiene un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica una única poliproteína grande de aproximadamente 3000 aminoácidos. En células infectadas, esta poliproteína se escinde en múltiples sitio por proteasas celulares y víricas para producir las proteínas estructurales y no estructurales (NS). En el caso de VHC, la generación de proteínas no estructurales maduras (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B) se efectúa mediante dos proteasas víricas. la primera de las cuales escinde la unión NS2-NS3; la segunda es una serina proteasa contenida en la región del extremo N de NS3 y media todas las escisiones posteriores corriente abajo de NS3, tanto en *cis*, en el sitio de escisión NS3-NS4A, y en *trans*, para el resto de sitios NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B. La proteína NS4A parece servir a múltiples funciones, actuando como un cofactor para la proteasa NS3 y ayudando posiblemente en la localización de la membrana de NS3 y otros componentes de las replicasas víricas. La formación del complejo de la proteína NS3 con NS4A es esencial para un procesamiento de la poliproteína eficaz, potenciando la escisión proteolítica en todos los sitios. La proteína NS3 presenta también actividades nucleósido trifosfatasa y ARN helicasa. NS5B es una ARN polimerasa dependiente de ARN que está implicada en la replicación del VHC.

55 La presente divulgación proporciona compuestos peptídicos que pueden inhibir el funcionamiento de la proteasa NS3, por ejemplo, en combinación con la proteasa NS4A.

En su primer aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (I)



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que

- 5  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$  y  $R^{10}$  se seleccionan de forma independiente entre hidrógeno y deuterio; con la condición de que al menos uno sea diferente de hidrógeno.

En una primera realización del primer aspecto, la primera divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que cada  $R^1$  es deuterio. En una segunda realización del primer aspecto cada  $R^2$  es deuterio. En una tercera realización del primer aspecto, cada  $R^3$  es deuterio.

En una cuarta realización del primer aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que cada  $R^4$  es deuterio.

15 En una quinta realización del primer aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (I), o un de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que  $R^5$  es deuterio.

En una sexta realización del primer aspecto la presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que cada  $R^6$  es deuterio. En una séptima realización, cada  $R^7$  es deuterio.

En una octava realización del primer aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que cada  $R^8$  es deuterio. En una novena realización, cada  $R^9$  es deuterio. En una décima realización, cada  $R^{10}$  es deuterio.

En un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende el compuesto de Fórmula (I) o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una primera realización del segundo aspecto, la composición comprende además al menos un compuesto adicional que tiene una actividad anti-VHC. En una segunda realización del segundo aspecto, al menos uno de los compuestos adicional es un interferón o una ribavirina. En una tercera realización del segundo aspecto, el interferón se selecciona entre interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón de consenso, interferón alfa 2A e interferón tau linfoblastoide.

En una cuarta realización del segundo aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende el compuesto de Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, un vehículo farmacéuticamente aceptable, y al menos un compuesto adicional que tiene actividad anti-VHC, en el que al menos uno de los compuestos adicionales se selecciona entre interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de linfocitos T auxiliares de tipo 1, ARN interferente, ARN anti-sentido, Imiquimod, ribavirina, un inhibidor de la inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina, y rimantadina.

En una quinta realización del segundo aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende el compuesto de Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, un vehículo farmacéuticamente aceptable, y al menos un compuesto adicional que tiene actividad anti-VHC, en el que al menos uno de los compuestos adicionales es eficaz para inhibir la función de una diana seleccionada entre metaloproteasa

de VHC, serina proteasa de VHC, polimerasa de VHC, helicasa de VHC, proteína NS4B de VHC, entrada de VHC, ensamblaje de VHC, salida de VHC, proteína NS5A de VHC, e IMPDH para el tratamiento de una infección por VHC.

5 En un tercer aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprenda un compuesto de Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, uno, dos, tres, cuatro, o cinco compuestos adicionales que tienen actividad anti-VHC, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una primera realización del tercer aspecto, la composición comprende tres a cuatro compuestos adicionales que tienen actividad anti-VHC. En una segunda realización del tercer aspecto, la composición comprende uno o dos compuestos adicionales que tienen actividad anti VHC. La presente divulgación describe un método de tratar una infección por VHC en un

10 paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En una primera realización del cuarto aspecto, el método comprende además administrar al menos un compuesto adicional que tiene una actividad anti-VHC antes de, después, o simultáneamente con el compuesto de Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En una segunda realización del cuarto aspecto, al menos uno de los compuestos adicionales es un interferón o una

15 ribavirina. En una tercera realización del cuarto aspecto, el interferón se selecciona entre interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón de consenso, interferón alfa 2A e interferón tau linfoblastoide. La presente divulgación describe también un método de tratar una infección por VHC en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y al menos un compuesto adicional que tiene una actividad anti-VHC antes de,

20 después, o simultáneamente con el compuesto de Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que al menos uno de los compuestos adicionales se selecciona entre interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de linfocitos T auxiliares de tipo 1, ARN interferente, ARN anti-sentido, Imiquimod, ribavirina, un inhibidor de la inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina, y rimantadina. Además, la presente divulgación describe un método de tratar una infección por VHC en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de

25 Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y al menos un compuesto adicional que tiene una actividad anti-VHC antes de, después, o simultáneamente con el compuesto de Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en el que al menos uno de los compuestos adicionales es eficaz para inhibir la función de una diana seleccionada entre metaloproteasa de VHC, serina proteasa de VHC, polimerasa de VHC,

30 helicasa de VHC, proteína NS4B de VHC, entrada de VHC, ensamblaje de VHC, salida de VHC, proteína NS5A de VHC, e IMPDH para el tratamiento de una infección por VHC. Y por último, la presente divulgación describe un método de tratar una infección por VHC en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, dos, tres, cuatro, o cinco compuestos adicionales que tienen actividad anti-VHC, antes de, después o simultáneamente

35 con el compuesto de fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o administrar tres o cuatro compuestos adicionales que tienen actividad anti-VHC o administrar uno o dos compuestos adicionales que tienen actividad anti-VHC.

40 Otros aspectos de la presente divulgación pueden incluir las combinaciones adecuadas de realizaciones divulgadas en el presente documento.

Otros aspectos y realizaciones adicionales pueden encontrarse en la descripción proporcionada en el presente documento.

45 Debe entenderse que los compuestos abarcados por la presente divulgación son aquellos que son estables de forma adecuada para uso como agente farmacéutico.

50 Se pretende que la definición de cualquier sustituyente o variable en una localización concreta en una molécula sea independiente de sus definiciones en otra parte en esta molécula. Por ejemplo, cada caso de los tres grupos R<sup>4</sup> puede ser igual o diferente.

Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

55 Se entiende que la incorporación del deuterio en Fórmulas o esquemas puede indicarse mediante el uso de los símbolos "D", "d" o "<sup>2</sup>H".

60 Los compuestos de la presente divulgación pueden existir como sales farmacéuticamente aceptables. El término "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, representa sales o formas de iones híbridos de los compuestos de la presente divulgación que son solubles en agua o aceite o dispersables, que están, comprendidas en el alcance de un criterio médico sensato, y son adecuadas para el uso en contacto con los tejidos de los pacientes sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación acorde con una relación beneficio/riesgo razonables, y son eficaces para su uso previsto. Las sales pueden prepararse durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos o haciendo reaccionar una funcionalidad básica adecuada con un ácido adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, citrato,

65 aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato; digluconato, glicerofosfato,

hemisulfato, heptanoato, hexanoato, formiato, fumarato, sales clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, mesitilensulfonato, metanosulfonato, naftilensulfonato, nicotinato, 2-naftalensulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tricloroacetato, trifluoroacetato, fosfato, glutamato, bicarbonato, paratoluensulfonato, y undecanoato. Los ejemplos de ácidos que se pueden formar para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, y fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, maleico, succínico, y cítrico.

Pueden prepararse sales de adición básicas durante el aislamiento y purificación final de los compuestos haciendo reaccionar un grupo ácido con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico o con amonio o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Los cationes de las sales farmacéuticamente aceptables incluyen litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, y aluminio, así como cationes de aminas cuaternarias tales como amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina, tributilamina, piridina, *N,N*-dimetilanilina, *N*-metilpiperidina, *N*-metilmorfolina, dicitlohexilamina, procaína, dibencilamina, *N,N*-dibencilfenetilamina, y *N,N*-dibenciletilendiamina. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, y piperazina.

Tal como se usa en el presente documento, el término "actividad anti-VHC" significa que el compuesto es eficaz para tratar el virus VHC.

Se entiende que la expresión "compuestos de la divulgación", y expresiones equivalentes, abarcan los compuestos de fórmula (I), y los enantiómeros, diastereómeros, y sus sales farmacéuticamente aceptables. De manera similar, se entiende que las referencias a los intermedios, abarcan sus sales cuando el contexto lo permite de esta manera.

El término "paciente" incluye seres humanos y otros mamíferos.

La expresión "composición farmacéutica" significa una composición que comprende un compuesto de la divulgación combinado con al menos un vehículo farmacéutico adicional, es decir, adyuvante, excipiente o vehículo, tales como diluyentes, agentes conservantes, rellenos, agentes reguladores de flujo, agentes disgregantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes perfumantes, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes lubricantes y agentes dispensadores, dependiendo de la naturaleza del modo de administración y las formas de dosificación. Se pueden usar, por ejemplo, los ingredientes que se relacionan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1999).

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que se encuentran comprendidos, comprendidas en el alcance de un criterio médico sensato, y son adecuadas para el uso en contacto con los tejidos de los pacientes sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación acorde con una relación de riesgo/beneficio razonable.

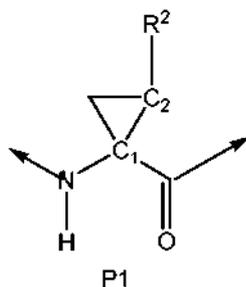
La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad total de cada principio activo que es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el paciente, por ejemplo, una reducción sostenida en la carga vírica. Cuando se aplica a un principio activo individual, administrado en solitario, el término se refiere a un ingrediente en solitario. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya se administren en combinación, en serie o de manera simultánea.

Los términos "tratar" y "que trata" se refieren a: (i) prevenir que una enfermedad, trastorno o dolencia se produzca en un paciente que puede estar predispuesto a la enfermedad, trastorno y/o dolencia pero al que no se le ha pronosticado todavía teniéndola; (ii) inhibir la enfermedad, trastorno o dolencia, es decir, detener su desarrollo; y (iii) aliviar la enfermedad, trastorno o dolencia, es decir, producir la regresión de la enfermedad, trastorno y/o dolencia.

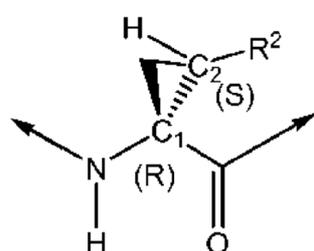
Cuando se usan nombrando compuestos de la presente divulgación, La designación P1', P1, P2, P2\*, P3, y P4, como se usa en el presente documento, cartografían las posiciones relativas de los restos de aminoácidos de la unión de un inhibidor de la proteasa con respecto a la unión del sustrato de escisión peptídica natural. La escisión se produce en el sustrato natural entre P1 y P1' donde las posiciones sin prima designan los aminoácidos que comienzan desde el final del término C del sitio de escisión natural del péptido que se extiende hacia el término N; mientras que, las posiciones primas emanan del extremo del término N de la designación del sitio de escisión y se extiende hacia el término C. Por ejemplo, P1' se refiere a la primera posición lejos desde el extremo derecho del término C del sitio de escisión (es decir, la primera posición del término N); mientras que P1 comienza la numeración desde el extremo izquierdo del sitio de escisión del término C, P2: segunda posición desde el término C, etc.). (Véase Berger A. y Schechter I., Transactions of the Royal Society London series (1970), B257, 249-264).

Los centros asimétricos existen en los compuestos de la presente divulgación. Por ejemplo, Los compuestos pueden

incluir el elemento ciclopropilo en P1 de fórmula

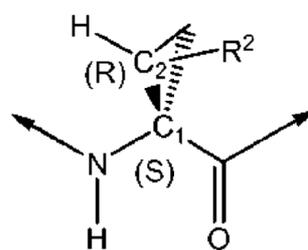


- 5 en la que  $C_1$  y  $C_2$  representan cada uno un átomo de carbono asimétrico en las posiciones 1 y 2 del anillo de ciclopropilo.



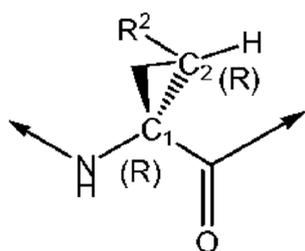
(1R, 2S)

$R^2$  es sin a carbonilo



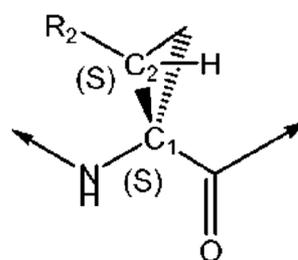
(1S, 2R)

$R^2$  es sin a carbonilo



(1R, 2R)

$R^2$  es sin a amida



(1S, 2S)

$R^2$  es sin a amida

- 10 Debe entenderse que la divulgación abarca todas las formas estereoquímicas, o sus mezclas, que poseen la capacidad de inhibir la proteasa del VHC.

- 15 Determinados compuestos de la presente divulgación pueden existir también en diferentes formas conformacionales estables que pueden ser separables. La asimetría de torsión debida a una restricción en las rotaciones alrededor de un enlace simple asimétrico, por ejemplo las debidas al impedimento estérico o tensiones en el anillo, pueden permitir la separación de los diferentes confórmeros. La presente divulgación incluye cada isómero conformacional de estos compuestos y sus mezclas.

- 20 Determinados compuestos de la presente divulgación pueden existir en forma de ion híbrido, y la presente divulgación incluye formas de iones híbridos de estos compuestos y sus mezclas.

- 25 Cuando es posible que, para su uso en tratamiento, se puedan administrar cantidades terapéuticamente eficaces de un compuesto de fórmula (I), así como sus sales farmacéuticamente aceptables, como la sustancia química pura, es posible presentar el principio activo como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas, que incluyen cantidades terapéuticamente eficaces de compuestos de fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables, y uno o más vehículos, diluyentes o

excipientes farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, son como se ha descrito anteriormente. El(los) vehículo(s), diluyente(s) o excipiente(s) deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para sus receptores. De acuerdo con otro aspecto de la divulgación se proporciona también un proceso para la

5 preparación de una formulación farmacéutica que incluye premezclar un compuesto de fórmula (I), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las formulaciones farmacéuticas pueden presentarse en formas farmacéuticas unitarias que contienen una cantidad predeterminada de principio activo por dosis unitaria. Niveles de dosificación de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 150 miligramos ("mg/kg") de peso corporal por día, preferentemente entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día de los compuestos de la divulgación son típicos en una monoterapia para la prevención y el tratamiento de la enfermedad mediada por VHC. Normalmente, las composiciones farmacéuticas de esta divulgación se administrarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 5

10 veces por día o, de forma alternativa, como una infusión continua. Dicha administración puede utilizarse como tratamiento crónico o agudo. La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales vehículos para producir una forma farmacéutica unitaria variará dependiendo de la dolencia que se está tratando, de la gravedad de la dolencia, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción del compuesto empleado, la duración del tratamiento, y la edad, el género, el peso y la dolencia del paciente. Las formulaciones farmacéuticas unitarias preferidas son las que contienen una dosis o una subdosis diaria unitaria, como se enumera anteriormente en el presente documento, o una de sus fracciones adecuadas, de un principio activo. En general, el tratamiento se inicia con dosificaciones pequeñas sustancialmente por debajo de la dosis óptima del compuesto. A continuación, la dosificación se aumenta en pequeñas cantidades hasta que se alcanza el efecto óptimo en las circunstancias dadas. En general, el compuesto se administra de forma más deseable a un nivel de concentración que dará generalmente

25 lugar a resultados antiviricos eficaces sin producir ningún efecto secundario peligroso o perjudicial.

Cuando las composiciones de la presente divulgación comprenden una combinación de un compuesto de la divulgación y uno o más agentes terapéuticos y/o profilácticos adicionales, el compuesto y el agente adicional pueden estar presentes en una dosis que es menor de o igual a la dosificación normalmente administrada en un régimen de monoterapia. Las composiciones de la presente divulgación pueden formularse simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, por ejemplo, en la forma de un comprimido monolítico y/o bi/multicapa o se pueden administrar por separado del(de los) agente(s) terapéutico(s) o profiláctico(s).

30

Las formulaciones farmacéuticas pueden adaptarse para la administración mediante cualquier ruta adecuada, por ejemplo, mediante la ruta oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual, o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intracutánea, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional, intravenosa, o inyecciones o infusiones intradérmicas). Dichas formulaciones pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia, por ejemplo, asociando el principio activo con el(los) vehículo(s) o excipiente(s).

35

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral pueden presentarse como unidades individuales tales como cápsulas o comprimidos; polvos o gránulos; soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos; espumas o batidos comestibles; o emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones de agua en aceite.

40

Por ejemplo, para la administración oral en forma de un comprimido o una cápsula, el componente de fármaco activo puede combinarse con un vehículo inerte oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como etanol, glicerol, agua y similares. Los polvos se prepararon triturando el compuesto hasta un tamaño fino adecuado y mezclándolo con un vehículo farmacéutico triturado de forma similar tal como un hidrato de carbono comestible, como, por ejemplo, almidón o manitol. Pueden estar también presentes agentes aromatizantes, conservantes, dispersantes, y colorantes.

50

Se preparan cápsulas preparando una mezcla en polvo, como se ha descrito anteriormente, y rellenando vainas de gelatinas formadas. Se pueden añadir agentes deslizantes y lubricantes tales como sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, o polietilenglicol sólido a la mezcla de polvo antes de la operación de relleno. Se puede añadir también un agente disgregante o solubilizante tal como agar-agar, carbonato de calcio, o carbonato de sodio para mejorar la disponibilidad del medicamento cuando se ingiere la cápsula.

55

Además, cuando se desee o sea necesario, se pueden incorporar también agentes aglutinantes, lubricantes, disgregantes y agentes colorantes adecuados en la mezcla. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato sódico, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, pero sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana y similares. Los comprimidos se formulan, por ejemplo, preparando una mezcla pulverulenta, granulando o suspendiendo, añadiendo un lubricante y disgregante, y presionando en comprimidos. Se preparó una mezcla pulverulenta mezclando el compuesto, triturado

60

65

de forma adecuada, con un diluyente o base como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente, con un aglutinante tal como una carboximetilcelulosa, un alginato, gelatina, o polivinil pirrolidona, una solución retardante tal como parafina, un acelerador de la resorción tal como una sal cuaternaria y/o un agente de absorción tal como bentonita, caolín, o fosfato dicálcico. La mezcla pulverulenta puede granularse humectándola con un aglutinante tal como un jarabe, pasta de almidón, mucílago de acacia, o soluciones de materiales celulósicos o poliméricos y forzándola a pasar a través de un tamiz. Como una alternativa a la granulación, la mezcla pulverulenta, la mezcla pulverulenta se puede procesar a través de la empastilladora y el resultado son piezas brutas formadas imperfectamente rotas en gránulos. Los gránulos pueden ser lubricarse para evitar que se pegue a las matrices que conforman el comprimido por medio de la adición de ácido esteárico, una sal de estearato, talco o aceite mineral. A continuación la mezcla lubricada se comprime en comprimidos. Los compuestos de la presente divulgación pueden combinarse también con un vehículo inerte de flujo libre y se comprimen en forma de comprimidos directamente sin pasar por los pasos de granulación o suspensión. Se puede proporcionar un revestimiento protector transparente u opaco que consiste de un revestimiento sellador de shellac, un revestimiento de azúcar o material polimérico, y un revestimiento de cera pulida. Se pueden añadir colorantes a estos revestimientos para distinguir diferentes dosificaciones unitarias.

Se pueden preparar fluidos orales tales como soluciones, jarabes, y elixires en foranas farmacéuticas unitarias de tal manera que una cantidad dada contiene una cantidad predeterminada del compuesto. Se pueden preparar jarabes disolviendo el compuesto en una solución acuosa aromatizada adecuada, a la vez que se preparan elixires mediante el uso de un vehículo no tóxico. Pueden añadirse también solubilizantes y emulsionantes tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados y éteres de sorbitol polioxietileno, conservantes, aditivos aromatizantes tales como aceite de menta piperita o edulcorantes naturales, o sacarina u otros edulcorantes artificiales, y similares.

Cuando sea adecuado, las formulaciones farmacéuticas unitarias para la administración oral pueden microencapsularse. Puede prepararse también la formulación para prolongar o sostener la liberación, como por ejemplo, revistiendo o incluyendo el material particulado en polímeros, cera, o similares.

Los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden administrarse también en la forma de sistemas de administración de liposomas, tales como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares. Los liposomas pueden formarse a partir de varios fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina, o fosfatidilcolinas.

Los compuestos de fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden administrarse también mediante el uso de anticuerpos monoclonales como vehículos individuales a los cuales se acoplan las moléculas del compuesto. Los compuestos pueden también acoplarse con polímeros solubles como vehículos de fármacos direccionables. Dichos polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxi propilmetacrilamidafenol, polihidroxi etilaspirtamidafenol, o polietileno oxidopolilisina sustituidos con restos de palitoílo. Además, los compuestos puede acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para conseguir, por ejemplo, ácido poliláctico, poliépsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque de hidrogeles reticulados o anfipáticos.

Las formulaciones adaptadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches individuales previstos para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo prolongado de tiempo. Por ejemplo, el producto activo puede administrarse a partir del parche mediante iontoforesis como se describe generalmente en *Pharmaceutical Research*, 3(6), 318 (1986).

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica pueden formularse como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles, o aceites.

Para los tratamientos del ojo u otros tejidos externos, por ejemplo, la boca y la piel, las formulaciones se aplican preferentemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formulan en una pomada, el principio activo puede emplearse ya sea con una base de pomada parafínica o bien miscible en agua. Como alternativa, el principio activo puede formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua o como una base de agua en aceite.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para administraciones tópicas al ojo, incluyen gotas oculares, en las que el principio activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar, pastillas, y enjuagues bucales.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración rectal pueden presentarse como supositorios o como enemas.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración nasal en las que el vehículo es un sólido que incluye un polvo grueso que se administra en la manera en la que se toma el rapé, es decir, mediante inhalación rápida a través de las fosas nasales a partir de un envase con el polvo sujetado cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido, para la administración como aerosol nasal o gotas nasales, incluyen

soluciones acuosas o soluciones oleosas del principio activo.

5 Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración mediante inhalación incluyen partículas finas de polvo o niebla, que se pueden generar por medio de diversos tipos de aerosoles presurizados de dosis medidas, nebulizadores, o insufladores.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas, o formulaciones en aerosol.

10 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones estériles para inyección acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que vuelven a la formulación isotónica con la sangre del destinatario previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en estado criodesecado (liofilizado) que requiere únicamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones improvisadas para inyección a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

20 Debe entenderse que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo, los adecuados para la administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

25 La Tabla 1 relaciona a continuación algunos ejemplos ilustrativos de compuestos que se pueden administrar con los compuestos de la presente divulgación. Los compuestos de la divulgación pueden administrarse con otros compuestos de actividad anti-VHC en tratamiento combinado, tanto juntos como por separado, o combinando los compuestos en una composición.

Tabla 1

Marca comercial	Clase fisiológica	Tipo de inhibidor o diana	Empresa de origen
NIM811		Inhibidor de la ciclofilina	Novartis
Zadaxin		Inmunomodulador	Esciclona
Suvus		Azul de metileno	Bioenvision
Actilon (CPG10101)		Agonistas de TLR9	Coley
Batabulina (T67)	Anticancerígeno	Inhibidor de la $\beta$ -tubulina	Tularik Inc., South San Francisco, CA
ISIS 14803	Antivírico	anti-sentido	ISIS Pharmaceuticals Inc, Carlsbad, CA/Elan Pharmaceuticals Inc., Nueva York, NY
Summetrel	Antivírico	antivírico	Endo Pharmaceuticals Holdings Inc., Chadds Ford, PA
GS-9132 (ACH-806)	Antivírico	Inhibidor de VHC	Achillion / Gilead
Compuestos de pirazolopirimidina y sales del documento WO-2005047288 26 de mayo de 2005	Antivírico	Inhibidores de VHC	Arrow Therapeutics Ltd.
Levovirina	Antivírico	Inhibidor de IMPDH	Ribapharm Inc., Costa Mesa, CA
Merimepodib (VX-497)	Antivírico	Inhibidor de IMPDH	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA
XTL-6865 (XTL-002)	Antivírico	anticuerpo monoclonal	XTL Biopharmaceuticals Ltd., Rehovot, Isreal
telaprevir (VX-950, LY-570310)	Antivírico	Inhibidor de la serina proteasa NS3	Vertex Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA/ Eli Lilly and Co. Inc., Indianapolis, IN
HCV-796	Antivírico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Wyeth / Viropharma
NM-283	Antivírico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Idenix / Novartis
GL-59728	Antivírico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Gene Labs / Novartis
GL-60667	Antivírico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Gene Labs / Novartis
2'C MeA	Antivírico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Gilead

ES 2 650 223 T3

PSI 6130	Antivirico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Roche
R1626	Antivirico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Roche
2'C Metil adenosina	Antivirico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Merck
JTK-003	Antivirico	inhibidor de rdRp	Japan Tobacco Inc., Tokio, Japón
Levovirina	Antivirico	ribavirina	ISIS Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA
Ribavirina	Antivirico	ribavirina	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Viramidina	Antivirico	Profármaco de ribavirina	Ribapharm Inc., Costa Mesa, CA
Heptazima	Antivirico	ribozima	Ribozyme Pharmaceuticals Inc., Boulder, CO
<i>Marca comercial</i>	<i>Clase fisiológica</i>	<i>Tipo de inhibidor o diana</i>	<i>Empresa de origen</i>
BILN-2061	Antivirico	Inhibidor de la serina proteasa	Boehringer Ingelheim Pharma KG, Ingelheim, Alemania
SCH 503034	Antivirico	Inhibidor de la serina proteasa	Schering Plough
Zadazim	Inmunomodulador	Inmunomodulador	SciClone Pharmaceutical s Inc., San Mateo, CA
Ceplene	Inmunomodulador	inmunomoduladores	Maxim Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
CellCept	Inmunosupresor	Inmunosupresor IgG de VHC	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basilea, Suiza
Civacir	Inmunosupresor	Inmunosupresor IgG de VHC	Nabi Biopharmaceuticals Inc., Boca Raton, FL
Albuferon - α	Interferón	albúmina IFN-α2b	Human Genome Sciences Inc., Rockville, MD
Infergen A	Interferón	IFN alfacon-1	InterMune Pharmaceutical s Inc., Brisbane, CA
Omega IFN	Interferón	IFN-ω	Intarcia Therapeutics
IFN-β y EMZ701	Interferón	IFN-β y EMZ701	Transition Therapeutics Inc., Ontario, Canadá
Rebif	Interferón	IFN-β1a	Serono, Ginebra, Suiza
Roferon A	Interferón	IFN-α2a	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basilea, Suiza
Intrón A	Interferón	IFN-α2b	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Intrón A y Zadaxin	Interferón	IFN-α 2b/α 1-timosina	RegeneRx Biopharmaceuticals Inc., Bethesda, MD/ SciClone Pharmaceutical s Inc, San Mateo, CA
Rebetron	Interferón	IFN-α2b/ribavirina	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
Actimmune	Interferón	INF-γ	InterMune Inc., Brisbane, CA
interferón-β	Interferón	Interferón-β-1a	Serono
Multiferon	Interferón	Long lasting IFN	Viragen/Valentis
Wellferon	Interferón	IFN-αn1 linfoblastoide	Glaxo SmithKline plc, Uxbridge, Reino Unido
Omniferon	Interferón	IFN-α natural	Viragen Inc., Plantation, FL
Pegasys	Interferón	IFN-α2a PEGilado	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basilea, Suiza
Pegasys y Ceplene	Interferón	inmunomodulador de IFN-α 2a PEGilado	Maxim Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
Pegasys y Ribavirina	Interferón	IFN-α 2a/ribavirina	F. Hoffmann-La Roche LTD, Basilea, Suiza
PEG-Intrón	Interferón	IFN-α 2b PEGilado	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ
PEG-Intrón / Ribavirina	Interferón	IFN-α 2b/ribavirina PEGilada	Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ

IP-501	protección del hígado	antifibrótico	Indevus Pharmaceuticals Inc., Lexington, MA
IDN-6556	protección del hígado	inhibidor de la caspasa	Idun Pharmaceuticals Inc., San Diego, CA
ITMN-191 (R-7227)	Antivirico	Inhibidor de la serina proteasa	InterMune Pharmaceuticals Inc., Brisbane, CA
GL-59728	Antivirico	Inhibidor de la replicasa NS5B	Genelabs
ANA-971	Antivirico	Agonistas de TLR-7	Anadys
MK 78009	Antivirico	Inhibidor de la serina proteasa	Merck
TMC-435350	Antivirico	Inhibidor de la serina proteasa	Tibotec

Los compuestos de la divulgación pueden utilizarse también como reactivos de laboratorio. Los compuestos pueden ser instrumentales al proporcionar herramientas de investigación para diseñar ensayos de replicación vírica, la validación de sistemas de ensayo animal y estudios de biología estructural para mejorar además el conocimiento de los mecanismos de la enfermedad del VHC. Adicionalmente, los compuestos de la presente divulgación son útiles al establecer o determinar el sitio de unión de otros compuestos antiviricos, por ejemplo, mediante inhibición competitiva.

Los compuestos de la presente divulgación pueden utilizarse también para tratar o evitar la contaminación vírica de materiales y por tanto reducen el riesgo de infección vírica de laboratorio o personal médico o pacientes que entran en contacto con dichos materiales, por ejemplo, sangre, tejidos, instrumentos y prendas quirúrgicos, instrumentos y prendas de laboratorio, y aparatos y materiales de recogida o transfusión de sangre.

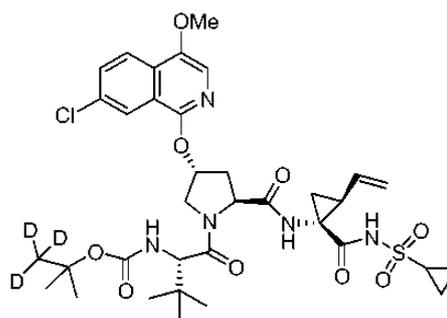
Se pretende que esta divulgación abarque compuestos que tienen la fórmula (I) cuando se preparan mediante procesos sintéticos o mediante procesos metabólicos incluyendo aquellos que se producen en el cuerpo humano o animal (*in vivo*) o procesos que se producen *in vitro*.

La presente divulgación se describirá ahora vinculada con determinadas realizaciones. Las abreviaturas utilizadas en la presente solicitud, incluidas particularmente en los esquemas y ejemplos ilustrativos que siguen, son bien conocidas de los expertos en la materia. Algunas de las abreviaturas utilizadas son las siguientes: Et<sub>3</sub>N para trietilamina; DPPA para difenilfosforilazida; h o hr o hrs para horas; EtOAc para acetato de etilo; Ph para fenilo; min o mins para minutos; RT o Rt o rt para temperatura ambiente o tiempo de retención (lo dictará el contexto); DMSO para dimetilsulfóxido; THF para tetrahidrofurano; n-BuLi para n-butilitio; i-Pr para isopropilo; i-PrO para isopropoxi; MeOH para metanol; TMS para trimetilsililo, tBu para terc-butilo; t-BuO para terc-butoxi; Ts o p-Ts para toliilsulfonilo; iPr<sub>2</sub>EtN o DIPEA para diisopropiletilamina; HATU para hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio; Et para etilo; y Et<sub>2</sub>O para dietil éter.

Los materiales de partida útiles para sintetizar los compuestos de la presente divulgación son conocidos por los expertos en la materia y se pueden fabricar fácilmente o están comercialmente disponibles.

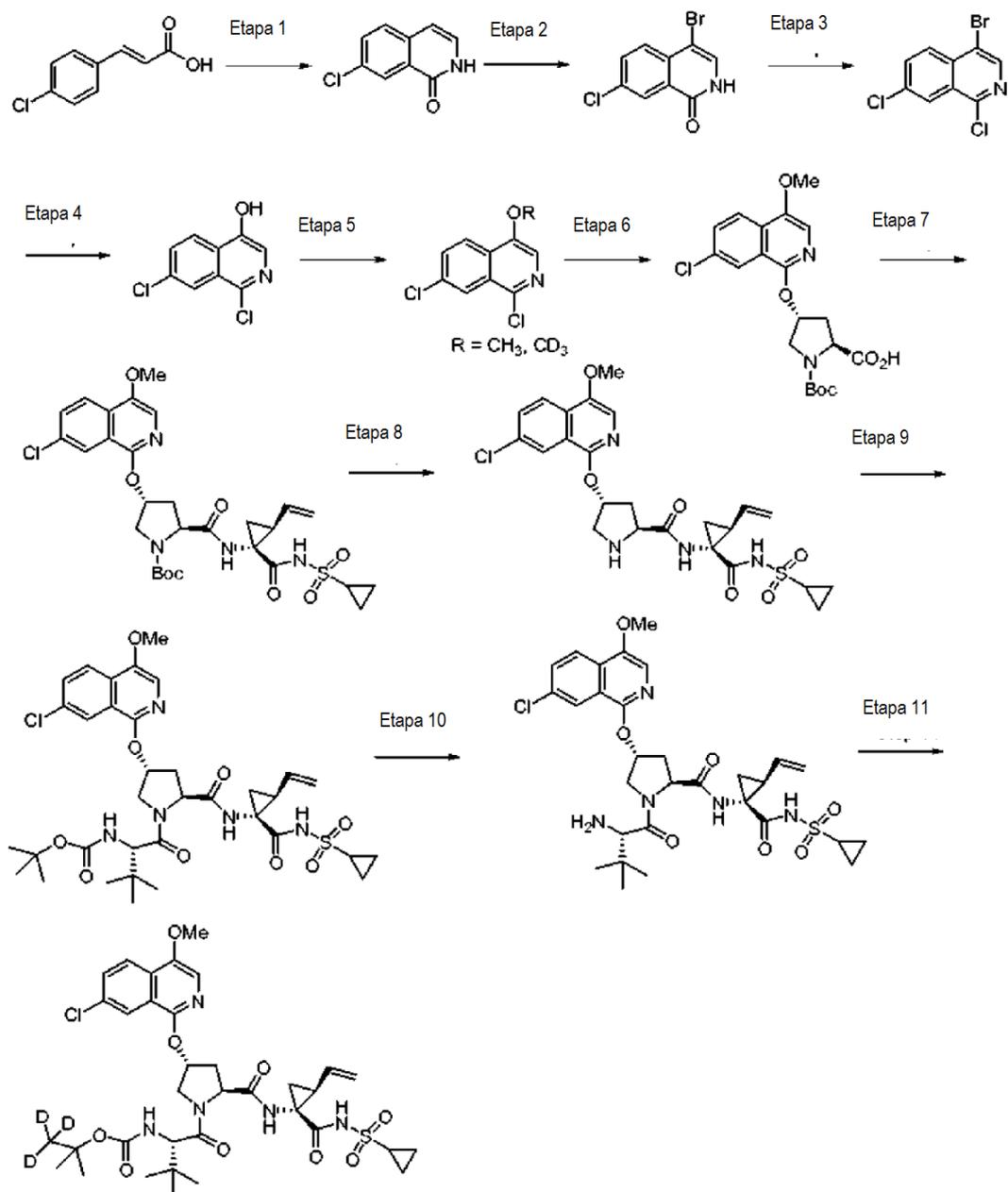
Los siguientes métodos que se muestran a continuación se proporcionan a fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de las reivindicaciones. Se reconocerá que puede ser necesario preparar dicho compuesto en el que se protege un grupo funcional utilizando un grupo protector convencional y eliminar a continuación el grupo protector para proporcionar un compuesto de la presente divulgación. Son conocidos por los expertos en la materia los detalles que se refieren al uso de grupos protectores de acuerdo con la presente divulgación.

#### Ejemplo 1001: Preparación de los Compuestos 1001



Compuesto 1001

Esquema 1

**Etapa 1**

- 5 A una solución de ácido (*E*)-3-(4-clorofenil)acrílico (18,3 g, 0,1 mol) y Et<sub>3</sub>N (20,2 g, 0,2 mol) en benceno (100 ml) se añadió gota a gota DPPA (27,5 g, 0,1 mol). Después de agitar durante 2 h, La solución se concentró y se purificó mediante cromatografía (Biotage, fase móvil 20/80 EtOAc/hexanos) para dar 16 g de una azida intermedia como un sólido. Este intermedio se disolvió en 100 ml de Ph<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> y la mezcla resultante se calentó lentamente a 90 °C durante un periodo de tiempo de 30 min. La mezcla de reacción se calentó a reflujo y se mantuvo a esta temperatura
- 10 durante 3h. Después de enfriar a RT, un precipitado sólido que se recogió mediante filtración y se lavó con tolueno para proporcionar 9,5 g de 7-cloroisoquinolin-1(2H)-ona (53 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ ppm 6,66 (d, J = 7,05 Hz, 1 H), 7,18 (d, J = 7,05 Hz, 1 H), 7,66 (s, 1 H) 7,67 (d, J=2,01 Hz, 1 H), 8,24 (d, J = 2,27 Hz, 1 H); RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm 104,05, 125,62, 127,21, 128,54, 129,52, 130,77, 132,43, 136,55, 160,72; CL/EM, EM m/z (M+H)<sup>+</sup> 180.

15

**Etapa 2**

Una suspensión del producto de la Etapa 1, Ejemplo 1001, 7-cloroisoquinolin-1(2H)-ona (36,33 g, 203 mmol) y N-bromosuccinimida (39,74 g, 223,3 mmol) en CH<sub>3</sub>CN anhidro (500 ml) se calentó lentamente a un reflujo suave durante un periodo de aproximadamente 2 h y se mantuvo a un reflujo suave durante 1,5 h. La reacción se vigiló mediante CL/EM y, tras completarse, la suspensión, se enfrió lentamente a temperatura ambiente durante un periodo de 3 h. El sólido precipitado se recogió mediante filtración y se lavó con CH<sub>3</sub>CN (100 ml x 3) para proporcionar 47 g (90 %) de 4-bromo-7-cloroisoquinolin-1(2H)-ona. Este material se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ ppm 7,46 (s, 1H), 7,81 (dd, J = 8,40, 2,00 Hz, 1H), 7,88 (d, J = 8,8 Hz, 1 H), 8,27 (d, J = 2,00 Hz, 1 H); RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm 96,68, 126,34, 127,58, 127,71, 130,73, 132,20, 133,47, 134,46, 159,88; CL/EM, EM m/z (M+H)<sup>+</sup> 258.

### Etapa 3

Una solución heterogénea del producto de la Etapa 2, Ejemplo 1001, 4-bromo-7-cloroisoquinolin-1(2H)-ona (47 g, 182 mmol) en POCl<sub>3</sub> (200 ml, 2,15 mol) se calentó lentamente a reflujo durante un periodo de 1 h. Debe señalarse que durante este proceso de calentamiento, la mezcla de reacción llegó a ser homogénea. La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo durante 4 h antes de enfriarse a temperatura ambiente y se concentró para eliminar el POCl<sub>3</sub> en exceso. Para asegurar la eliminación completa del POCl<sub>3</sub> residual, el residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o, como alternativa, tolueno y se concentró al vacío. Este proceso se repitió según fue necesario. (Señalar que POCl<sub>3</sub> se dispuso adecuadamente en frascos de vidrio que se etiquetaron en correspondencia). El residuo se capturó en 600 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se enfrió a -35 °C, se neutralizó y se basificó posteriormente de forma cuidadosa con NaOH 1 N (400 ml) hasta que la mezcla se volvió ligeramente básica (pH = 8). La capa orgánica se separó, se lavó con H<sub>2</sub>O, se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El sólido residual se cristalizó a partir de EtOAc (aproximadamente 50 ml) para dar 32 g de 4-bromo-1,7-dicloroisoquinolina. El licor madre procedente del proceso de cristalización se concentró y se purificó mediante Biotage (EtOAc al 16 % en hexanos) para proporcionar 4 g más de 4-bromo-1,7-dicloroisoquinolina como un sólido. En total se obtuvieron 36 g (73 %) de 4-bromo-1,7-dicloroisoquinolina. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,80 (dd, J=8,81, 2,01 Hz, 1H), 8,14 (d, J = 9,06 Hz, 1 H), 8,34 (d, J = 1,76 Hz, 1 H), 8,48 (s, 1 H); RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm 118,39, 125,06, 127,59, 128,71, 133,89, 134,14, 134,93, 143,18, 148,98; CL/EM, EM m/z (M+H)<sup>+</sup> 275.

### Etapa 4

A una suspensión de solución del producto de la Etapa 3, Ejemplo 1001, 4-bromo-1,7-dicloroisoquinolina (22,16 g, 80 mmol) en THF (500 ml) mantenida a -78 °C se añadió n-BuLi 1,6 M en hexanos (100 ml, 160 mmol) gota a gota mediante cánula durante 15 min (la temperatura interna se mantuvo a <-65 °C). La solución se agitó durante 0,5 h, y se añadió gota a gota (i-PrO)<sub>3</sub>B (37 ml, 160 mmol) mediante jeringa durante 10 min (la temperatura interna se mantuvo a <-65 °C). La mezcla de reacción se agitó durante 0,5 h y se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % (80 ml, 776 mmol) gota a gota mediante un embudo de adición durante 10 min (la temperatura interna aumentó a -60 °C durante esta adición), seguido por la adición de una solución de NaOH 1 N (80 ml, 80 mmol). Se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h más. Tras confirmar la finalización de la reacción mediante CL/EM, la mezcla de reacción se enfrió a -40 °C y se añadieron 100 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (0,793 moles) en 400 ml de H<sub>2</sub>O gota a gota durante 30 min (la temperatura interna se mantuvo entre 5-10°C). La suspensión resultante se neutralizó con HCl 6 N (aproximadamente 50 ml) a 0 °C para proporcionar un pH ~ 6. La mezcla se diluyó con 500 ml de EtOAc y se decantó en un embudo separador de 2 l. Al sólido restante en el recipiente de reacción se añadieron 500 ml de H<sub>2</sub>O y 300 ml de EtOAc y la mezcla se neutralizó con HCl 6 N (aproximadamente 20 ml). Se combinaron las capas orgánicas en un embudo separador, se lavaron con salmuera (300 ml x 3) y H<sub>2</sub>O (200 ml x 3). La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub>, se filtró para eliminar el agente de secado, y se concentró para dar un producto bruto que se trituró con 50 ml de EtOAc. El sólido resultante se recogió por filtración, se enjuagó con EtOAc (3 x 25 ml) y se secó para proporcionar 1,7-dicloroisoquinolin-4-ol (2 ciclos: 12,0 g, 70 % y 13,8 g, 81 %). Los filtrados se combinaron, se concentraron y se purificaron mediante Biotage (EtOAc al 35 % en hexanos) para dar 2,1 g más de BMS-796007. En total, se obtuvieron 27,9 g (82 %) de 1,7-dicloroisoquinolin-4-ol. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ ppm 4,05 (s, 3 H), 7,4 (s, 1 H), 7,76 (dd, J = 8,8, 2, Hz, 1 H), 8,16 (d, J = 2 Hz, 1 H), 8,23 (d, J = 8,8 Hz, 1 H); RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm 123,78, 124,66, 125,62, 127,03, 127,71, 130,72, 133,80, 137,63; 148,88; CL/EM, EM (m/z) (M+H)<sup>+</sup> 213.

### Etapa 5

#### Preparación de 1,7-dicloro-4-metoxiisoquinolina:

A una suspensión del producto de la Etapa 4, Ejemplo 1001, A 1,7-dicloroisoquinolin-4-ol (16 g, 75,5 mmol) en MeOH/CH<sub>3</sub>CN (30 ml/300 ml) mantenido a 0 °C se añadió gota a gota una solución 2 M de TMSCHN<sub>2</sub> en hexanos (60 ml, 120 mmol). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 14 h. La solución se concentró y el sólido residual se recrystalizó a partir de EtOAc (aproximadamente 50 ml) para dar 8,1 g de 1,7-dicloro-4-metoxiisoquinolina con EtOAc al 25 % en hexanos. El licor madre se concentró y se purificó mediante Biotage (EtOAc al 16 % en hexanos) para proporcionar 3,2 g de 1,7-dicloro-4-metoxiisoquinolina como un sólido. En total, se obtuvieron 11,3 g (66 %) de 1,7-dicloro-4-metoxiisoquinolina. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,05 (s, 3 H), 7,67 (dd, J = 9,06, 2,01 Hz, 1H), 7,80 (s, 1 H), 8,16 (d, J = 8,81 Hz, 1 H), 8,23 (d, J = 2,01 Hz, 1 H); RMN <sup>13</sup>C (101

MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm 56,68, 122,70, 123,99, 124,14, 126,67, 127,83, 131,43, 134,10, 139,75, 149,94; CL/EM, EM m/z (M+H)<sup>+</sup> 228.

*Preparación de 1,7-dicloro-4-(D<sub>3</sub>-metoxi)isoquinolina:*

5 Una mezcla de la Etapa 4, Ejemplo 1001, 1,7-dicloroisoquinolin-4-ol (321 mg, 1,5 mmol), ICD<sub>3</sub> (217 mg, 1,500 mmol), y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (622 mg, 4,50 mmol) en acetona (10 ml) se mantuvo a reflujo durante 20 h. tras la filtración, el filtrado se concentró y se purificó mediante Biotage eluyendo con acetato de etilo al 10 % en hexano para dar 250 mg del producto deseado como un sólido. CL/EM, EM (m/z) (M+H)<sup>+</sup> 231,09.

*Etapa 6*

15 A una mezcla del producto de la Etapa 5, Ejemplo 1001, 1,7-dicloro-4-metoxiisoquinolina (4,52 g, 20 mmol), Al ácido (2S,4R)-1-(terc-butoxicarbonil)-4-hidroxipirrolidina-2-carboxílico (5,08 g, 22 mmol) y t-BuOK (6,72 g, 60 mmol) se añadió DMSO (200 ml) con agitación a 10°C. La suspensión resultante se sometió a sonicación durante 30 min para proporcionar una solución homogénea que se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se inactivó mediante la adición de H<sub>2</sub>O (50 ml). La mezcla se neutralizó, a continuación se acidificó, hasta un pH final de 5 mediante la adición cuidadosa de una solución acuosa de HCl 1 N. La mezcla se extrajo con EtOAc (400 ml) y se lavó la capa orgánica con salmuera (200 ml), H<sub>2</sub>O (200 ml x 2) antes de secarse con MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío para proporcionar 8,36 g de un sólido bruto de ácido (2S,4R)-1-(terc-butoxicarbonil)-4-(7-cloro-4-metoxiisoquinolin-1-iloxi)pirrolidina-2-carboxílico. Este material se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ ppm 2,34 - 2,47 (m, 1 H), 2,62-2,77 (m, 1 H), 3,70- 3,92 (m, 2 H), 4,42- 4,59 (m, 1 H), 5,65 (s a, 1 H), 7,54 (s, 1 H), 7,68 (dd, J = 8,81, 2,01 Hz, 1H), 8,02- 8,13 (m, 2 H); RMN <sup>13</sup>C(126 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm 13,90, 14,04, 20,71, 22,02, 27,84, 27,98, 30,91, 35,00, 35,87, 51,84, 52,08, 56,21, 57,49, 57,80, 59,70, 73,32, 25 73,87, 79,14, 79,19, 119,11, 119,77, 122,38, 123,35, 128,50, 130,95, 132,25, 145,70, 151,94, 153,25, 153,71, 173,51, 173,98; EM (M+H)<sup>+</sup> 423.

*Etapa 7*

30 A una solución del producto de la Etapa 6, Ejemplo 1001, (2S,4R)-1-(terc-butoxicarbonil)-4-(7-cloro-4-metoxiisoquinolin-1-iloxi)pirrolidina-2-carboxílico (8,36 g, 19,8 mmol), sal de TsOH de (1R,2S)-1-amino-N-(ciclopropilsulfonil)-2-vinilciclopropanocarboxamida (9,64g, 24 mmol), e iPr<sub>2</sub>EtN (17,4 ml, 100 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 ml) se añadió HATU (11,4 g, 31 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 16 h, se concentró al vacío y el residuo se disolvió en EtOAc (300 ml) y se lavó posteriormente con HCl 1 N (50 ml x 3), agua (30 ml x 2), y salmuera (50 ml x 2). Los extractos orgánicos se secaron con MgSO<sub>4</sub>, se concentraron, y se purificaron utilizando un Biotage (acetona al 25 % en hexanos) para proporcionar 11,5 g del producto bruto 4-(7-cloro-4-metoxiisoquinolin-1-iloxi)-2-((1R,2S)-1-(ciclopropilsulfonilcarbamoil)-2-vinilciclopropilcarbamoil)pirrolidina-1-carboxilato de (2S,4R)-terc-butilo. este compuesto se purificó mediante cristalización a partir de MeOH (40 ml) para dar como resultado 11 g (88 %) de un sólido cristalino. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ ppm 1,03-1,31 (m, 8 H), 1,43 (s, 9H), 1,88 (dd, J = 8,06, 5,54 Hz, 1H), 2,17- 2,36 (m, 2 H), 2,53 (dd, J = 13,72, 6,42 Hz, 1H), 2,90- 3,03 (m, 1 H), 3,72- 3,93 (m, 2 H), 4,40 (dd, J = 9,69, 6,92 Hz, 1H), 5,13 (d, J = 10,32 Hz, 1 H), 5,31 (d, J = 17,12 Hz, 1 H), 5,65-5,93 (m, 2 H), 7,55 (s, 1 H), 7,70 (dd, J = 8,94, 2,14 Hz, 1H), 8,06 (d, J = 2,01 Hz, 1 H), 8,09 (d, J = 8,81 Hz, 1 H); RMN <sup>13</sup>C(126 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ ppm 5,47, 5,57, 5,75, 19,85, 22,38, 27,90, 27,99, 30,65, 30,72, 32,11, 33,81, 35,11, 36,30, 40,86, 41,59, 48,56, 52,39, 52,76, 56,24, 58,76, 59,21, 73,57, 74,06, 79,28, 80,06, 117,80, 119,16, 119,81, 119,88, 122,14, 123,48, 128,52, 45 131,00, 132,28, 133,38, 145,72, 151,77, 151,86, 154,06, 168,38, 169,13, 172,46, 173,27; EM: (M+H)<sup>+</sup> 635.

*Etapa 8*

50 Una suspensión del producto de la Etapa 7, Ejemplo 1001, 4-(7-cloro-4-metoxiisoquinolin-1-iloxi)-2-((1R,2S)-1-(ciclopropilsulfonilcarbamoil)-2-vinilciclopropilcarbamoil)pirrolidina-1-carboxilato de (2S,4R)-terc-butilo (6,34 g, 10 mmol) en 50 ml de MeOH que contenía 3 ml de HCl concentrado se mantuvo a reflujo durante 2 h, La solución se enfrió a temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo sólido se capturó en Et<sub>2</sub>O seco (50 ml) y la solución se concentró al vacío. Este proceso, se repitió cinco veces para asegurar la completa eliminación de agua y el HCl solubilizado, proporcionó 6,07 g (2S,4R)-4-(7-cloro-4-metoxiisoquinolin-1-iloxi)-N-((1R,2S)-1-(ciclopropilsulfonilcarbamoil)-2-vinilciclopropil)pirrolidina-2-carboxamida como sal de HCl (100 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ ppm 0,96 - 1,21 (m, 3 H), 1,22- 1,30 (m, 1 H), 1,38 (dd, J = 9,57, 5,54 Hz, 1H), 1,95 (dd, J = 8,06, 5,79 Hz, 1H), 2,25- 2,46 (m, 2 H), 2,83- 3,08 (m, 2 H), 3,75- 3,90 (m, 2 H), 4,01 (s, 3 H), 4,70 (dd, J = 10,32, 7,81 Hz, 1H), 5,10- 5,20 (m, 1 H), 5,33 (d, J = 17,12 Hz, 1 H), 5,58- 5,76 (m, 1 H), 5,88 (s, 1 H), 7,57 (s, 1 H), 7,74 (dd, J = 8,81, 2,01 Hz, 1H), 8,12 (d, J = 9,06 Hz, 1 H), 8,28 (d, J = 2,01 Hz, 1 H); RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ ppm 6,52, 60 6,65, 22,60, 31,99, 34,63, 37,04, 43,18, 52,95, 56,85, 60,56, 76,08, 119,06, 119,10, 121,65, 123,93, 124,63, 130,72, 132,37, 133,78, 134,76, 148,49, 153,02, 170,08, 170,67; CL/EM EM m/z (M+H)<sup>+</sup> 535.

*Etapa 9*

65 A una solución del producto de la Etapa 8, Ejemplo 1001, (2S,4R)-4-(7-cloro-4-metoxiisoquinolin-1-iloxi)-N-((1R,2S)-1-(ciclopropilsulfonilcarbamoil)-2-vinilciclopropil)pirrolidina-2-carboxamida como sal de HCl (6.07 g, 10 mmol) en 100

ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, mantenido a 0°C, se añadió 8,7 ml de iPr<sub>2</sub>EtN (50 mmol) seguido por Boc-L-*terc*-leucina (2,772 g, 12 mmol) y HATU (5,7 g, 15 mmol). La mezcla de reacción se calentó a RT y se agitó durante 16 h antes de concentrarse al vacío y el residuo se disolvió en EtOAc (300 ml). La solución de EtOAc se lavó secuencialmente con HCl 1 N (50 ml x 3), H<sub>2</sub>O (30 ml x 2), y salmuera (50 ml x 2). La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío y se obtuvo el producto bruto tras la purificación usando un Biotage (acetona al 33 % en hexanos) para proporcionar 7 g (94 %) del producto deseado. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD δ ppm 1,00-1,06 (m, 11 H), 1,16 (s, 9 H), 1,14-1,24 (m, 2 H), 1,44 (dd, J = 9,32, 5,29 Hz, 1H), 1,88 (dd, J = 8,06, 5,54 Hz, 1H), 2,17- 2,39 (m, 2 H), 2,59 (dd, J = 13,85, 6,80 Hz, 1H), 2,87- 3,02 (m, 1 H), 4,00 (s, 3 H), 4,01- 4,14 (m, 1 H), 4,17- 4,24 (m, 1 H), 4,43 (d, J = 12,09 Hz, 1 H), 4,52- 4,65 (m, 1 H), 5,12 (d, J = 10,07 Hz, 1 H), 5,30 (d, J = 16,87 Hz, 1 H), 5,65- 5,91 (m, 2 H), 7,56 (s, 1H), 7,68 (d, J = 9,06 Hz, 1 H), 8,05 (s, 1 H), 8,09 (d, J = 9,06 Hz, 1 H), EM: (M+H)<sup>+</sup> 748.

#### Etapa 10

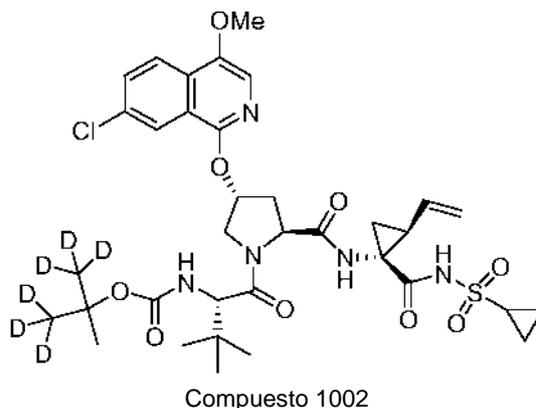
Al producto de la Etapa 9, Ejemplo 1001, (S)-1-((2S,4R)-4-(7-cloro-4-metoxisquinolin-1-iloxi)-2-((1R,2S)-1-(ciclopropilsulfonilcarbamoil)-2-vinilciclopropilcarbamoil)pirrolidin-1-il)-3,3-dimetil-1-oxobutan-2-ilcarbamato de *terc*-butilo (2,469 g, 3.3 mmol) se añadió HCl 4 M (8,25 ml, 33,0 mmol) en 1,4-dioxano. La solución formada se agitó a 25 °C durante 3 h. Tras la concentración al vacío, al residuo se añadió éter (20 ml), a continuación se concentró de nuevo, se repitió el procedimiento 3 veces. El secado mediante el sistema de vacío proporcionó 2,36 g (100 %) del producto bruto como un sólido, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. EM: (M+H)<sup>+</sup> 648,50.

#### Etapa 11

Una solución del producto de la Etapa 10, Ejemplo 1001, (2S,4R)-1-((S)-2-amino-3,3-dimetilbutanoil)-4-(7-cloro-4-metoxisquinolin-1-iloxi)-N-((1R,2S)-1-(ciclopropilsulfonilcarbamoil)-2-vinilciclopropil)pirrolidina-2-carboxamida, HCl (30 mg, 0,044 mmol), El reactivo 2 (9,56 mg, 0,048 mmol), y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (0,038 ml, 0,219 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Volumen: 3 ml) se agitó durante 16 h. Tras la concentración, el residuo se purificó mediante HPLC prep para dar 21 mg (64 %) del producto deseado del compuesto 1001 como un sólido. RMN <sup>1</sup>H(400 MHz, MeOD) δ ppm 0,99 - 1,13 (m, 11 H), 1,17 (s, 6 H), 1,21- 1,32 (m, 2 H), 1,45 (dd, J = 9,4, 5,4 Hz, 1H), 1,89 (dd, J = 8,2, 5,4 Hz, 1H), 2,20- 2,35 (m, 2 H), 2,61 (dd, J = 13,7, 6,9 Hz, 1H), 2,91- 3,01 (m, 1 H), 4,01 (s, 3 H), 4,03- 4,12 (m, 1 H), 4,18- 4,23 (m, 1 H), 4,43 (s, 1 H), 4,57 (dd, J = 10,2, 7,2 Hz, 1H), 5,14 (dd, J = 10,3, 1,5 Hz, 1H), 5,32 (d, J = 17,1 Hz, 1 H), 5,71- 5,85 (m, 2 H), 7,58 (s, 1 H), 7,69 (dd, J = 8,5, 1,8 Hz, 1H), 8,06 (d, J = 1,8 Hz, 1 H), 8,10 (d, J = 8,8 Hz, 1 H); EM: (M+H)<sup>+</sup> 751,31.

#### Ejemplo 1002: Preparación del Compuesto 1002

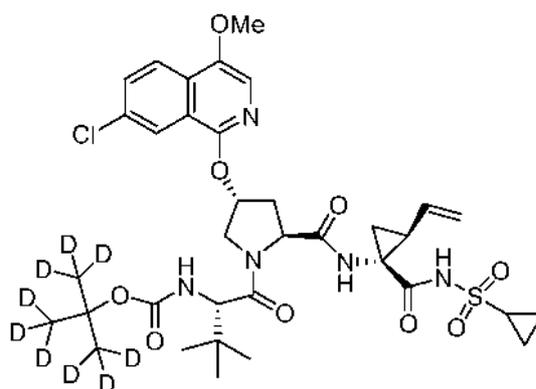
35



Se preparó el compuesto 1002 mediante un procedimiento similar al descrito para la preparación del compuesto 1001, EM: (M+H)<sup>+</sup> 754,35.

40

#### Ejemplo 1003: Preparación del Compuesto 1003



Compuesto 1003

5 Se preparó el compuesto 1003 mediante un procedimiento similar al descrito para la preparación del compuesto 1001, EM: (M+H)<sup>+</sup> 757,35.

#### Estudios biológicos

10 Se pueden preparar los ensayos enzimáticos del complejo de la proteasa NS3/4A de VHC y los ensayos del replicón de VHC basados en células, realizados y validados utilizando la información conocida en la materia, como se establece a continuación:

#### Generación del complejo de la proteasa NS3/4A de VHC recombinante

15 Se generaron complejos de la proteasa NS3 de VHC, derivados de la cepa BMS, cepa H77 o cepa J4L6S, como se describe a continuación. Estas proteínas recombinantes purificadas se generaron para el uso en un ensayo homogéneo (véase a continuación) para proporcionar una indicación de cómo los compuestos eficaces de la presente divulgación inhibirían la actividad proteolítica de NS3 de VHC.

20 Se obtuvo el suero de un paciente infectado con VHC del Dr. T. Wright, San Francisco Hospital. se construyó un molde de ADNc de longitud completa diseñado mediante ingeniería genética (ácido desoxirribonucleico del complemento) del genoma de VHC (cepa BMS) a partir de fragmentos de ADN obtenidos mediante transcripción inversa-PCT (RT-PCR) de ARN sérico (ácido ribonucleico) y utilizando los cebadores seleccionados sobre la base de la homología entre diferentes cepas del genotipo 1a. Para la determinación de la secuencia completa del  
25 genoma, se asignó un genotipo 1a del aislado de VHC de acuerdo con la clasificación de Simmonds et al. (véase P Simmonds, KA Rose, S Graham, SW Chan, F McOmish, BC Dow, EA Follett, PL Yap y H Marsden, J. Clin. Microbiol., 31(6), 1493-1503 (1993)). Se mostró qué secuencia de aminoácidos de la región no estructural, NS2-5B, era >97 % idéntica al genotipo 1a de VHC (H77) y un 87 % idéntica al genotipo 1b (J4L6S). Se obtuvieron los clones infecciosos, H77 (genotipo 1a) y J4L6S (genotipo 1b) de R. Purcell (NIH) y se publicaron las secuencias en el  
30 Genbank (AAB67036, véase Yanagi, M., Purcell, R.H., Emerson, S.U. y Bukh, J. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94(16), 8738-8743 (1997); AF054247, véase Yanagi, M., St Claire, M., Shapiro, M., Emerson, S.U., Purcell, R.H. y Bukh, J., Virology 244 (1), 161-172. (1998)).

35 Se utilizaron las cepas H77 y J4L6S para la producción de complejos de la proteasa NS3/4A recombinante. Se manipuló el ADN que codificaba el complejo de la proteasa NS3/4A de VHC recombinante (aminoácidos 1027 a 1711) para estas cepas como se ha descrito por P. Gallinari et al. (véase Gallinari P, Paolini C, Brennan D, Nardi C, Steinkuhler C, De Francesco R. Biochemistry. 38(17):5620-32, (1999)). En resumen, se añadió la cola de tres lisinas solubilizante en el extremo 3' de la región que codifica NS4rA. Se cambió la cisteína en la posición P1 del sitio de escisión NS4A-NS4B (aminoácido 1711) por una glicina para evitar la escisión proteolítica de la etiqueta de lisina.  
40 Además, se introdujo una mutación cisteína a serina mediante la PCR en la posición de aminoácido 1454 para prevenir la escisión autolítica en el dominio de la helicasa NS3. El fragmento del ADN variante se clonó en el vector de expresión bacteriana pET21b (Novagen) y el complejo NS3/4A se expresó en la cepa BL21 de Escherichia coli (DE3) (Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito por P. Gallinari et al. (véase Gallinari P, Brennan D, Nardi C, Brunetti M, Tomei L, Steinkuhler C, De Francesco R., J Virol. 72(8):6758-69 (1998)) con modificaciones. En  
45 resumen, se indujo la expresión del complejo de la proteasa NS3/4A con isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 milimolar durante 22 horas (h) a 20°C. Una fermentación típica (1 litro (l)) dio como resultado aproximadamente 10 gramos (g) de pasta de células húmeda. Las células se volvieron a suspender en tampón de lisis (10 ml/g) consistente en ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etan sulfónico) (HEPES) 25 mM, pH 7,5, glicerol al 20 %, cloruro de sodio (NaCl) 500 mM, Triton X-100 al 0,5 %, 1 microgramo/mililitro ("µg/ml") de lisozima, cloruro de  
50 magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 5 mM, 1 µg/ml de DnaseI, β-Mercaptoetanol (βME) 5 mM, Inhibidor de la proteasa-ácido etilendiamina tetraacético (EDTA) libre (Roche), se homogeneizó e incubó durante 20 minutos (min) a 4°C. El homogenizado se sometió a sonicación y se clarificó mediante ultracentrifugación a 235000 g durante 1 hora a 4°C. Se añadió imidazol al sobrenadante a la concentración final de 15 mM y se ajustó el pH a 8,0. El extracto de proteína

bruta se cargó en una columna de ácido níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA) preequilibrada con tampón B (HEPES 25 mM, pH 8,0, glicerol al 20 %, NaCl 500 mM, 0,5 % Triton X-100, imidazol 15 mM,  $\beta$ ME 5 mM). La muestra se cargó a un caudal de 1 ml/min. La columna se lavó con 15 volúmenes de columna de tampón C (igual que el tampón B excepto con Triton X-100 al 0,2 %). La proteína se eluyó con 5 volúmenes de columna de tampón D (igual que el  
5 tampón C excepto con imidazol 200 mM).

Las fracciones que contienen el complejo de la proteasa NS3/4A se combinaron y cargaron en una columna de desalación Superdex-S200 preequilibrada con tampón D (HEPES 25 mM, pH 7,5, glicerol al 20 %, NaCl 300 mM, Triton X-100 al 0,2 %,  $\beta$ ME 10 mM). La muestra se cargó a un caudal de 1 ml/min. Las fracciones que contenían el  
10 complejo de la proteasa NS3/4A se combinaron y concentraron hasta aproximadamente 0,5 mg/ml. La pureza de los complejos de la proteasa NS3/4A, derivados de las cepas BMS, H77 y J4L6S, se consideraron mayores del 90 % mediante los análisis de SDS-PAGE y espectrometría de masas. La enzima se almacenó a -80°C, se descongeló en hielo y se diluyó antes del uso en tampón de ensayo.

#### 15 *Ensayo del péptido FRET para vigilar la actividad proteolítica de NS3/4A del VHC*

el objetivo de este ensayo in vitro era medir las inhibición de los complejos de la proteasa NS3 del VHC, derivados de la cepa BMS, la cepa H77 o cepa J4L6S, como se ha descrito anteriormente, mediante los compuestos de la presente divulgación. Este ensayo proporciona una indicación de cómo los compuestos eficaces de la presente  
20 divulgación inhibirían la actividad proteolítica de NS3 de VHC.

A fin de vigilar la actividad la actividad de la proteasa NS3/4A de VHC, se utilizó un sustrato del péptido NS3/4A. El sustrato era RET S1 (sustrato del depsipéptido de transferencia de la energía de resonancia; AnaSpec, Inc. n.º de catálogo 22991) (péptido FRET), descrito por Taliani et al. en Anal. Biochem. 240(2):60-67 (1996). La secuencia de este péptido está parcialmente basada en el sitio de escisión natural de NS4A/NS4B para la proteasa NS3 de VHC excepto que existe un enlace éster más bien que un enlace amida en el sitio de escisión. El péptido contiene también un donante de fluorescencia, EDANS, próximo a un extremo del péptido y un aceptor, DABCYL, próximo al otro extremo. la fluorescencia del péptido se inactivó mediante transferencia de energía de resonancia intermolecular /RET) entre el donante y el aceptor, pero como la proteasa NS3 escinde el péptido, los productos se liberan de la  
25 inactivación de RET y la fluorescencia del donante se vuelve evidente.  
30

El sustrato peptídico se incubó con uno de los tres complejos de la proteasa NS3/4A recombinante, en ausencia o presencia de un compuesto de la presente divulgación. Se determinaron los efectos inhibidores de un compuesto vigilando la formación de producto de reacción fluorescente en tiempo real utilizando un Cytofluor Series 4000.  
35

Los reactivos eran los siguientes: Se obtuvieron HEPES y Glicerol (ultrapuro) de GIBCO-BRL. Se obtuvo dimetil sulfóxido (DMSO) de Sigma. Se obtuvo  $\beta$ -Mercaptoetanol de Bio Rad.

Tampón de ensayo: HEPES 50 mM, pH 7,5; NaCl 0,15 M; Triton al 0,1 %; glicerol al 15 %;  $\beta$ ME 10 mM. Sustrato: concentración final 2  $\mu$ M (a partir de una solución madre 2 mM en DMSO almacenada a -20°C). proteasa NS3/4A de VHC de tipo 1a (1b), concentración final 2-3 nM (a partir de una solución madre 5  $\mu$ M en HEPES 25 mM, pH 7,5, glicerol al 20 %, NaCl 300 mM, Triton-X100 al 0,2 %,  $\beta$ ME 10 mM). para compuesto con potencias cercanas al límite de ensayo, el ensayo se hizo más sensible añadiendo 50  $\mu$ g/ml de albúmina de suero de bovino (Sigma) al tampón de ensayo y reduciendo la concentración final de proteasa a 300 pM.  
40  
45

El ensayo se llevó a cabo en una placa negra de poliestireno de 96 pocillos de Falcon. Cada pocillo contenía 25  $\mu$ l de complejo de proteasa NS3/4A en tampón de ensayo, 50  $\mu$ l de un compuesto de la presente divulgación en DMSO/tampón de ensayo al 10 % y 25  $\mu$ l de sustrato en tampón de ensayo. Se preparó también un control (sin compuesto) en la misma placa de ensayo. El complejo de enzima se mezcló con compuesto o solución control durante 1 min antes de iniciar la reacción enzimática mediante la adición de sustrato. La placa de ensayo se leyó inmediatamente utilizando el Cytofluor Series 4000 (Perspective Biosystems). El instrumento se configuró para leer una emisión de 340 nm y una excitación de 490 nm a 25°C. Las reacciones siguieron durante aproximadamente 15 min.  
50

55 Se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente ecuación:

$$100 - [(\delta F_{inh} / \delta F_{con}) \times 100]$$

60 donde  $\delta F$  es el cambio en la fluorescencia sobre el intervalo lineal de la curva. Se aplicó un ajuste no lineal a la curva a los datos de inhibición-concentración, y a continuación se calculó el 50 % de la concentración eficaz ( $CI_{50}$ ) mediante el uso del software Excel XLfit utilizando la ecuación,  $y = A + ((B - A) / (1 + ((C/x)^D)))$ .

Se encontró que los compuestos de la presente divulgación, que se analizaron frente a más de un tipo del complejo NS3/4A, tenían propiedades inhibitoras similares aunque los compuestos demostraron uniformemente mayor potencia frente a las cepas 1b en comparación con las cepas 1a.  
65

*Ensayos de especificidad*

Se llevaron a cabo los ensayos de especificidad para demostrar la selectividad in vitro de los compuestos de la presente divulgación en la inhibición del complejo de la proteasa NS3/4A de VHC en comparación con otras proteasas de serina o cisteína.

Se determinaron las especificidades de los compuestos de la presente divulgación frente a varias serina proteasas: elastasa de neutrófilos humanos (HNE), una elastasa pancreática de porcino (PPE) y quimotripsina pancreática humana y una cisteína proteasa: catepsina B de hígado humano. En todos los casos, se utilizó un protocolo de formato de placas de 96 pocillos utilizando un sustrato Amino- Metil-Coumarina (AMC) fluorométrico específico para cada enzima como se ha descrito anteriormente (solicitud de patente PCT n.º WO 00/09543) con algunas modificaciones para los ensayos de la serina proteasa. Todas las enzimas se adquirieron de Sigma, EMDbiosciences mientras que los sustratos eran de Bachem, Sigma y EMDbiosciences.

Las concentraciones del compuesto variaron de 100 a 0,4 µM dependiendo de su potencia. Los ensayos de la enzima se iniciaron cada uno mediante la adición de sustrato al inhibidor de la enzima preincubado durante 10 min a temperatura ambiente e hidrólisis con una conversión del 15 % como se midió en cytofluor.

Las condiciones finales para cada ensayo fueron las siguientes:

clorhidrato de tris(hidroximetil) aminometano 50 mM (Tris-HCl) pH 8, Sulfato de sodio 0,5 M (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, DMSO al 3 %, Tween-20 al 0,01 % con LLVY-AMC5 µM y quimotripsina 1 nM.

Tris HCl 50 M, pH 8,0 NaCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, DMSO al 3 %, Tween-20 al 0,02 %, succ-AAPV-AMC 5 µM y HNE 20 nM o PPE 8 nM;

NaOAc 100 mM (Acetato de sodio) pH 5,5, DMSO al 3 %, TCPE (clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina) 1 mM, Catepsina B 5 nM (solución madre de enzima activada en tampón que contiene TCEP 20 mM antes del uso), y Z-FR-AMC2 µM diluido en H<sub>2</sub>O. Se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la fórmula:

$$[1 - ((UV_{inh} - UV_{blank}) / (UV_{ctl} - UV_{blanco}))] \times 100$$

Se aplicó un ajuste no lineal a la curva a los datos de inhibición-concentración, y se calculó el 50 % de la concentración eficaz (CI<sub>50</sub>) mediante el uso del software Excel XLfit.

*Generación del replicón de VHC*

Se estableció un sistema de células completas del replicón de VHC como se describe por Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R., Science 285(5424):110-3 (1999). El sistema permitió a los inventores evaluar los efectos de sus compuestos de proteasas de VHC sobre la replicación del ARN de VHC. En resumen, utilizando la secuencia de la cepa 1b de VHC descrita en el artículo de Lohmann (número de registro AJ238799). se sintetizó un ADNc de VHC por Operon Technologies, Inc. (Alameda, CA), y a continuación se ensambló el replicón de longitud completa en el plásmido pGem9zf(+) (Promega, Madison, WI) utilizando técnicas de biología molecular normalizadas. El replicón consiste en (i) la 5' UTR de VHC fusionada a los primeros 12 aminoácidos de la proteína de la cápsida, (ii) el gen de la neomicina fosfotransferasa (neo), (iii) el IRES del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), y (iv) los genes NS3 y NS5B de VHC y la 3' UTR de VHC. Se linealizaron los ADN plásmidos con Scal y se sintetizaron los transcritos de ARN in vitro utilizando el kit de transcripción T7 MegaScript (Ambion, Austin, TX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los transcritos in vitro del ADNc se transflectaron en la línea de células de hepatoma humano, HUH-7. Se consiguió la selección de las células que expresan constitutivamente el replicón de VHC en presencia de un marcador seleccionable, neomicina (G418). Se caracterizaron las líneas celulares resultantes para la producción de ARN con hebras positivas y negativas y la producción de proteínas en el tiempo.

*Ensayo FRET del replicón de VHC*

Se desarrolló el ensayo FRET del replicón de VHC para vigilar los efectos inhibidores de los compuestos descritos en la divulgación de la replicación vírica del VHC. Células HUH-7, que expresan constitutivamente el replicón de VHC, se hicieron crecer en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco-BRL) que contenía suero de feto de ternera al 10 % (FCS) (Sigma) y 1 mg/ml de G418 (Gibco-BRL). Se sembraron las células la noche anterior (1,5 x 10<sup>4</sup> células/pocillo) en placas estériles de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Se prepararon controles con compuesto y sin compuesto en DMEM que contenía FCS al 4 %, 1:100 Penicilina/Estreptomocina (Gibco-BRL), 1:100 de L-glutamina y DMSO al 5 % en la placa de dilución (concentración final de DMSO al 0,5 % en el ensayo). Se añadieron las mezclas de compuesto/DMSO a las células y se incubaron durante 4 días a 37°C. después de 4 días, se evaluaron las células en primer lugar para la citotoxicidad utilizando alamar Blue (Trek Diagnostic Systems) para una lectura de la CC<sub>50</sub>. se determinó la toxicidad del compuesto (CC<sub>50</sub>) añadiendo 1/10<sup>9</sup> de volumen de alamar Blue al medio en el que se incubaban las células. Después de 4 h, se leyó la señal de fluorescencia de cada pocillo, con

una longitud de excitación a 530 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm, usando el Cytofluor Series 4000 (Perspective Biosystems). A continuación las placas se enjuagaron vigorosamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (3 veces 150 µl). Las células se lisaron con 25 µl de un reactivo de ensayo de lisis que contenía un sustrato de la proteasa de VHC (5X células de reactivo de lisis de cultivo de células de luciferasa) (Promega n.º E153A) se diluyó hasta 1X con agua destilada, se añadió NaCl hasta una concentración final 150 mM, el sustrato del péptido FRET (como se ha descrito para el ensayo de la enzima anterior) se diluyó hasta una concentración final 10 µM a partir de una solución madre 2 mM en DMSO al 100 %. La placa se colocó a continuación en el instrumento Cytofluor 4000 que se había configurado en modo automático a una excitación de 340 nm/emisión de 490 nm, durante 21 ciclos y se leyeron las placas en un modo cinético. Se llevaron a cabo las determinaciones de la CE<sub>50</sub> como se describe para las determinaciones de la CI<sub>50</sub>.

#### *Ensayo indicador de la luciferasa del replicón de VHC*

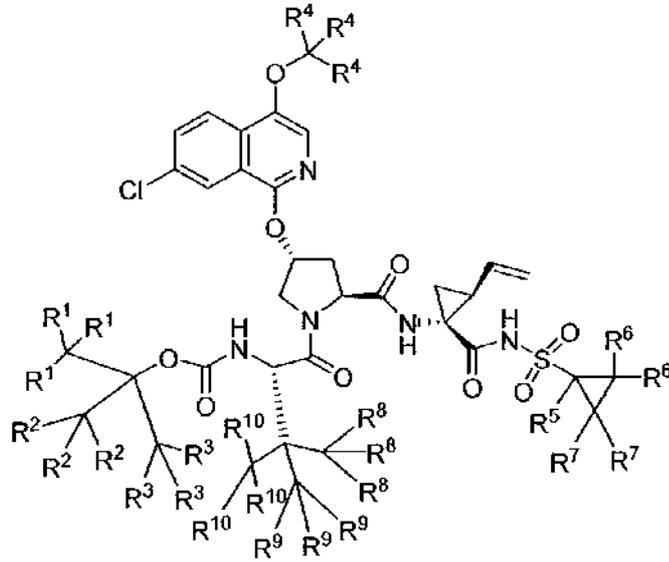
Como un ensayo secundario, se confirmaron las determinaciones de la CE<sub>50</sub> de a partir del ensayo FRET del replicón en un ensayo indicador de la luciferasa del replicón. La utilización de un ensayo indicador de la luciferasa de un replicón se describió en primer lugar por Krieger et al (Krieger N, Lohmann V, y Bartenschlager R, J. Virol. 75(10): 4614-4624 (2001)). Se modificó la construcción del replicón descrita para el ensayo FRET de los inventores insertando ADNc que codificaba una forma humanizada del gen de la luciferasa de Renilla y una secuencia enlazadora fusionada directamente con el extremo 3' de la gen de la luciferasa. Se introdujo esta inserción en la construcción del replicón utilizando un sitio de restricción Asc1 localizado en el núcleo, directamente corriente arriba del gen marcador de la neomicina. Se introdujo también la mutación adaptativa en la posición 1179 (serina a isoleucina) (Blight KJ, Kolykhalov, AA, Rice, CM, Science 290(5498):1972-1974). Se generó una línea de células estable que expresaba constitutivamente esta construcción del replicón de VHC como se ha descrito anteriormente. Se configuró el ensayo indicador de la luciferasa como se ha descrito para el ensayo FRET del replicón de VHC con las siguientes modificaciones. Tras 4 días en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37°C, se analizaron las células para la actividad de la luciferasa de Renilla utilizando el sistema de ensayo de la luciferasa Dual-Glo de Promega. Se retiraron los medios (100 µl) de cada pocillo que contenía las células. Hasta los 50 µl restante de medios, se añadieron 50 µl del reactivo de la luciferasa Dual-Glo, y se sacudieron las placas de 10 min a 2 h a temperatura ambiente. A continuación se añadió reactivo Dual-Glo Stop & Glo (50 µl) a cada pocillo, y las placas se sacudieron de nuevo durante 10 min a 2 h más a temperatura ambiente. Se leyeron las placas en un Packard TopCount NXT utilizando un programa de luminiscencia. Se calculó el porcentaje de utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de control} = \frac{\text{señal de luciferasa promedio en pocillos de experimentación (+ compuesto)}}{\text{señal de luciferasa promedio en pocillos de control con DMSO (- compuesto)}}$$

Los valores se representaron gráficamente y se analizaron utilizando XLfit para obtener el valor de la CE<sub>50</sub>.

REIVINDICACIONES

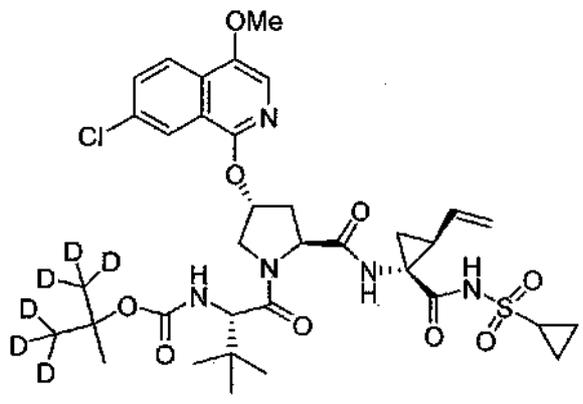
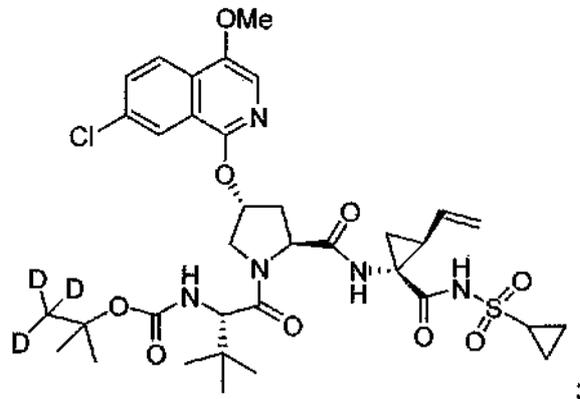
1. Un compuesto de Fórmula (I)



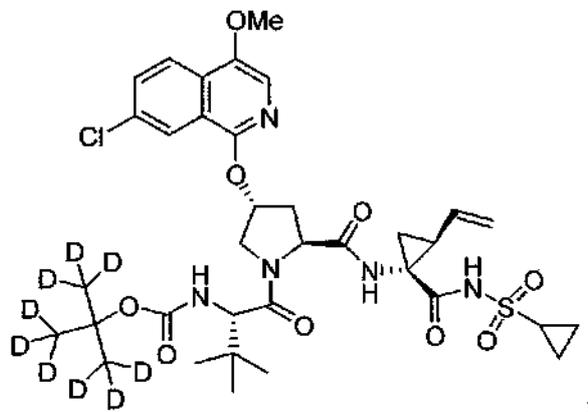
(I),

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> y R<sup>10</sup> se seleccionan de forma independiente entre hidrógeno y deuterio; con la condición de que al menos uno sea diferente de hidrógeno.

2. Un compuesto de la reivindicación 1 en el que cada R<sup>1</sup> es deuterio.
3. Un compuesto de la reivindicación 2 en el que cada R<sup>2</sup> es deuterio.
4. Un compuesto de la reivindicación 3 en el que cada R<sup>3</sup> es deuterio.
5. Un compuesto de la reivindicación 1 en el que cada R<sup>4</sup> es deuterio.
6. Un compuesto de la reivindicación 1 en el que cada R<sup>5</sup> es deuterio.
7. Un compuesto de la reivindicación 1 en el que cada R<sup>6</sup> es deuterio.
8. Un compuesto de la reivindicación 7 en el que cada R<sup>7</sup> es deuterio.
9. Un compuesto de la reivindicación 1 en el que cada R<sup>8</sup> es deuterio.
10. Un compuesto de la reivindicación 9 en el que cada R<sup>9</sup> es deuterio.
11. Un compuesto de la reivindicación 10 en el que cada R<sup>10</sup> es deuterio.
12. Un compuesto seleccionado entre



y

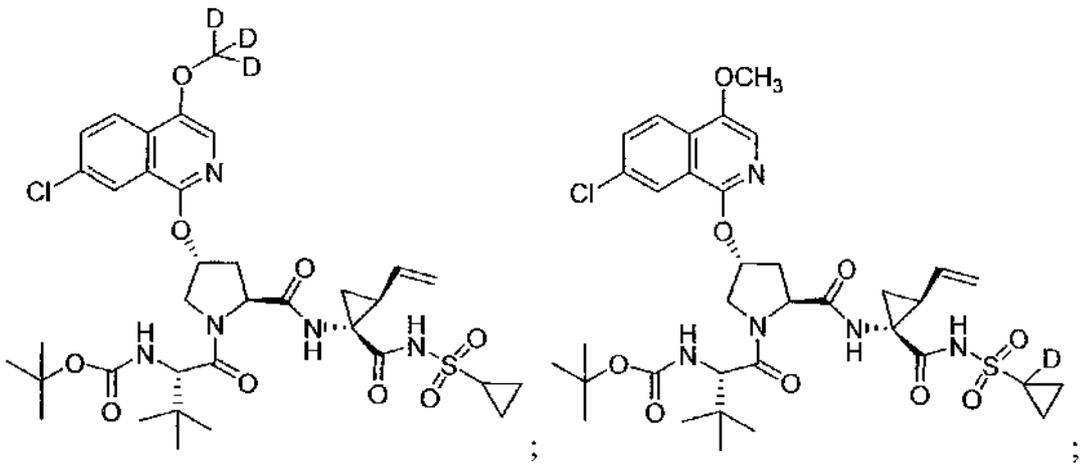


5

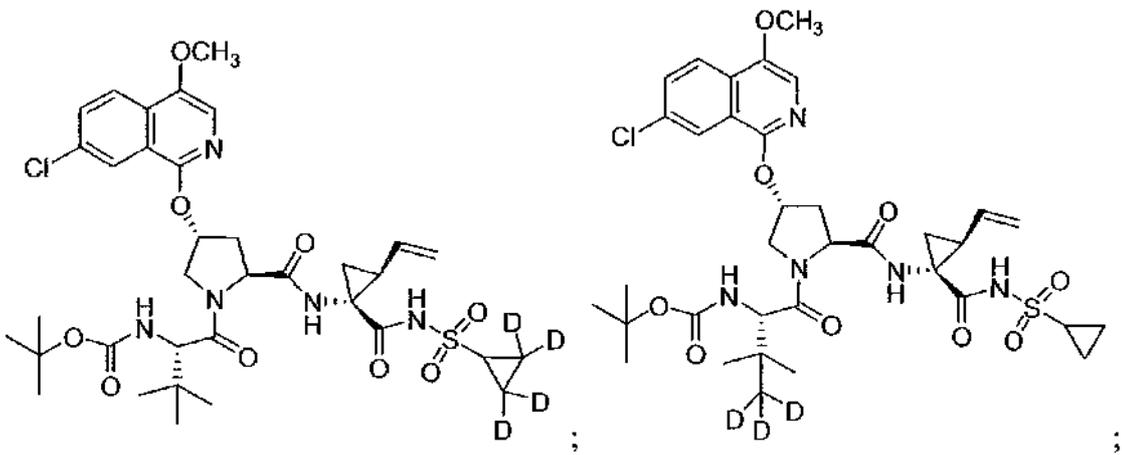
o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

13. Un compuesto seleccionado entre

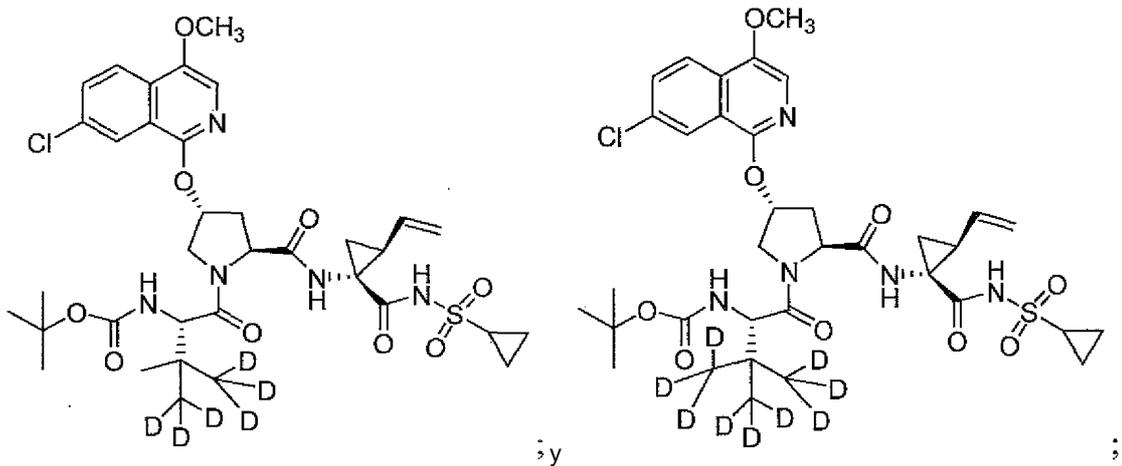
10



y



5



;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

10 14. Una composición que comprende el compuesto de la reivindicación 1, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. La composición de la reivindicación 14 que comprende además al menos un compuesto adicional que tiene actividad anti-VHC.

15 16. La composición de la reivindicación 15 en la que al menos uno de los compuestos adicionales es un interferón o una ribavirina.

17. La composición de la reivindicación 16 en la que el interferón se selecciona entre interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón de consenso, interferón alfa 2A e interferón tau linfoblastoide.
- 5 18. La composición de la reivindicación 15 en la que al menos uno de los compuestos adicionales se selecciona entre interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de linfocitos T auxiliares de tipo 1, ARN interferente, ARN anti-sentido, Imiquimod, ribavirina, un inhibidor de la inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina y rimantadina.
- 10 19. La composición de la reivindicación 15 en la que al menos uno de los compuestos adicionales es eficaz para inhibir la función de una diana seleccionada entre metaloproteasa de VHC, serina proteasa de VHC, polimerasa de VHC, helicasa de VHC, proteína NS4B de VHC, entrada de VHC, ensamblaje de VHC, salida de VHC, proteína NS5A de VHC e IMPDH para el tratamiento de una infección por VHC.
- 15 20. Un compuesto de la reivindicación 1 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en un método para tratar una infección por VHC.
- 20 21. El compuesto, o la sal, para el uso de acuerdo con la reivindicación 20 en el que el compuesto, o la sal, es para administrarse antes de, después o de forma simultánea con al menos un compuesto adicional que tiene actividad anti-VHC.
- 25 22. El compuesto, o la sal, para el uso de acuerdo con la reivindicación 21 en el que al menos uno de los compuestos adicionales es un interferón o una ribavirina.
- 30 23. El compuesto, o la sal, para el uso de acuerdo con la reivindicación 22 en el que el interferón se selecciona entre interferón alfa 2B, interferón alfa pegilado, interferón de consenso, interferón alfa 2A e interferón tau linfoblastoide.
- 35 24. El compuesto, o la sal, para el uso de acuerdo con la reivindicación 21 en el que al menos uno de los compuestos adicionales se selecciona entre interleuquina 2, interleuquina 6, interleuquina 12, un compuesto que potencia el desarrollo de una respuesta de linfocitos T auxiliares de tipo 1, ARN interferente, ARN anti-sentido, Imiquimod, ribavirina, un inhibidor de la inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa, amantadina y rimantadina.
25. El compuesto, o la sal, para el uso de acuerdo con la reivindicación 21 en el que al menos uno de los compuestos adicionales es eficaz para inhibir la función de una diana seleccionada entre metaloproteasa de VHC, serina proteasa de VHC, polimerasa de VHC, helicasa de VHC, proteína NS4B de VHC, entrada de VHC, ensamblaje de VHC, salida de VHC, proteína NS5A de VHC e IMPDH para el tratamiento de una infección por VHC.